

**PREPARATION OF LOW-MOLECULAR WEIGHT KERATINOUS SUBSTANCE**

Patent Number: JP57109797  
Publication date: 1982-07-08  
Inventor(s): MIYAMOTO TAKEAKI; others: 01  
Applicant(s): KAO SEKKEN KK  
Requested Patent: ☐ JP57109797  
Application Number: JP19800187190 19801226  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07G7/06  
EC Classification:  
Equivalents: JP1451681C, JP62057319B

**Abstract**

**PURPOSE:** To obtain an oligokeratin useful as a cosmetic base material for hair, etc. at a low cost without requiring the purifying step, by treating a fibrous reduced keratin reduced without collapsing the original fibrous shape with a proteolytic hydrolase.  
**CONSTITUTION:** A fibrous keratin, e.g. wool, feather or hair, is reduced in a reaction medium, e.g. water and/or an alcohol, with the original fibrous shape retained. The reduced fibrous keratin is then hydrolyzed with a proteolytic hydrolase, preferably an acidic enzyme, e.g. pepsin, in water at 35-40 deg.C at a pH  $\leq 6$  to give the aimed oligokeratinous substance. The reducing reaction is preferably carried out with a reducing agent, e.g. mercaptoethanol, at a pH of 1-8 in an inert gas, e.g. nitrogen.  
**EFFECT:** No use of a swelling agent or dissolution assistant is required for the keratinous substance, and the reduced keratin is easily separated.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

積構造(ジスルフィド結合、イオン架橋、水素結合、疎水性相互作用など)を備えているため不溶性であり、かつ酵素により加水分解され難いのが特徴である。羊毛の場合、未処理羊毛がブローナーゼで分解される割合は20%以下、トリプシンで分解される割合は高々10%、ペプシンで分解される割合は5%程度である〔参考文献：P.H.Springel, Aust. J. Biol. Sci., 16, 272(1963)、W.G.Grewtherら Advan. Protein Chem., 20, 191(1965)、W.G.Grewtherら J. Biol. Chem., 242, 4310(1967)〕。したがって、従来加水分解酵素を用いてオリゴケラチンを調整する方法としては、ケラチンを不溶化ならしめているジスルフィド結合を、尿素などの溶解助剤の共存下に還元剤の作用により開裂せしめ、ケラチンを一度液体媒体中に溶解した後に酵素を作用させる方法が知られている。しかし、このような方法によると、オリゴケラチンの分離回収のためには、尹過による還元時の不溶化部の尹

別、限外尹過、透析などによる尿素等の溶解助剤や還元剤の除去に多大の労力を必要とする。

本発明者らは、これら問題点を解決すべく鋭意検討した結果、原料の形態たとえば原毛の姿を崩さずに還元処理した繊維状還元ケラチン(ケラテイン)にタンパク加水分解酵素を作用させるだけで操作的に極めて簡便に、高収率で水および有機性溶媒に易溶性のオリゴケラチンが得られることを見出し、本発明に到達した。

即ち、本発明はケラチン物質を還元し、ついで加水分解するに際し、還元反応の前後において反応媒体中原料の形態を保持せしめたまま、該ケラチン物質に還元反応を施し、ついで、タンパク加水分解酵素を用いて水中にて加水分解反応を施すことを特徴とする低分子量ケラチン物質の製造方法を提供するものである。

本発明の目的は化粧品基材として優れた性能を有するオリゴケラチンの新規な製造方法を提供することにあるが、本発明の利点および特徴は以下の説明から明らかとなるであろう。

本発明の特徴は、(1)ケラチンを主成分として構成されている天然物質を還元して該ケラチン中のジスルフィド結合を開裂せしめるが、還元反応は反応後もケラチン物質が反応媒体中で原料の形態を保持した状態で存在するような条件下で行うこと、および(2)上記原料の形態を保持した還元ケラチン物質に従来ケラチン物質の酵素加水分解処理の際用いられてきたケラチン物質の膨潤剤あるいは溶解助剤等を用いることなく、直接加水分解酵素のみを作用させることにより、オリゴケラチンを高収率で製造することにある。

本発明の利点は、(1)還元ケラチン物質が還元反応媒体中でも、なお原料の形態を保持した状態で存在するため、還元反応媒体中からの還元ケラチンの分離が極めて容易であること、および(2)酵素加水分解反応は、用いる加水分解酵素の最適値となるよう調整するために添加された、ごく少量の酸或いは、アルカリのみを含有する水溶液中で行うことが出来、その結果水溶液中

に溶解したオリゴケラチンの分離回収に於て、煩雑な限外尹過や透析の工程を省略することが可能になり、オリゴケラチンの分離、回収が極めて容易なことにある。

本発明により提供されるオリゴケラチンは、一般に200から10,000の範囲の分子量、好適な条件下では500から5,000の範囲の分子量を有するものであり得る。また、上記オリゴケラチンはケラチンのポリペプチド鎖の架橋をなすジスルフィド結合の少なくとも一部が開裂され、その結果生成したチオール側鎖を有しているが、ポリペプチド鎖が本発明に有しているアミノ基、カルボキシル基、アルコール性及びフェノール性水酸基等の官能基に加えて、分子鎖末端にはアミノ基とカルボキシル基とを有し極めて官能性に富み、化粧品基材として優れた性能を有するものである。

以下、本発明の方法についてさらに具体的に説明する。

ケラチンは脊椎動物の皮膚及びそれより外部

に向つて発達した組織中に多量に存在する構造（組織）蛋白質の一種であり、従つて、本発明の方法において原料として使用されるケラチン物質としては、脊椎動物の角、蹄、爪、体毛、羽毛等、好ましくは羊毛及び羽毛が挙げられ、これらはそのまま、又は必要に応じて適当な大きさに粉砕乃至切断して使用することができる。

また、これらケラチン物質は、必要に応じて、洗浄、脱脂等の前処理を行なうこともできる。

本発明によれば、上記ケラチン物質は先ず還元される。還元は一般に液体媒体中で行なうことができる。使用し得る液体媒体は、還元に対して安定であることを要し、ケラチン物質が還元反応後においてもその原料の形態を保持するためには還元系媒体の選択はきわめて重要である。すなわち本発明において使用される液体媒体は還元反応前後のケラチンを溶解し、又は膨潤せしめないものが選ばなければならない。そのような媒体としては尿素等の溶解助剤を含まない水；メタノール、エタノール、n-プロ

ペノール、イソプロパノール等のアルコール類；或いは水とアルコール類との混合物が好適である。

還元に際して、前記した原料のケラチン物質を上記液体媒体中に浸漬する。その際、ケラチン物質対液体媒体の重量比には厳密な制限はないが、使用するケラチン物質の種類、形状等に応じて、少なくとも1:20以上、通常1:50～1:100の範囲とするのが好都合である。

還元剤としては、ケラチン物質中のジスルフィド結合( $-S-S-$ )をチオール基( $-SH$ )に開裂させることができる任意の還元剤が使用される。

使用し得る還元剤としては、一般にジスルフィド結合( $-S-S-$ )に対して求核的に作用するタイプの有機及び無機の還元剤が好ましく、有機還元剤としては、チオール誘導体及び有機化合物が適しており、具体的には例えばメルカプトエタノール、チオグリコール酸、トリブチルホスフィン、トリフェニルホスフィンなどが有

利に使用され、また無機還元剤としては例えば亜硫酸水素ナトリウム( $NaHSO_3$ )及び水酸化ナトリウム( $-NaSH$ )などが好適である。

還元はそれ自体公知の方法によつて行なうことができる〔参考文献：W.G.Growtherら *Advan. Protein Chem.*, 20, 191 (1965)、J.A.Maclaren, *Aust. J. Chem.*, 15, 824 (1962)、J.A.Maclarenら *Aust. J. Chem.*, 19, 2355 (1966)〕。例えば上記チオール誘導体又は無機還元剤を使用する場合は、使用するケラチン物質中のジスルフィド結合に対して、一般に過剰当量、通常ジスルフィド結合1個当たり少なくとも2倍当量、好ましくは4～10倍当量で使用するのが有利であり、また、前記有機化合物を使用する場合には、使用するケラチン物質中のジスルフィド結合に対して、一般に当量乃至若干過剰当量の有機化合物の使用で充分である。

尚、ケラチン物質中のジスルフィド結合の量は、アミノ酸分析により決定することができ、

その方法は公知である〔M.Friedman, A.T.Noma, *Textile Res. J.*, 40, 1073 (1970)〕。

還元は酸性、中性又はアルカリ性のいずれのpH条件下でも行なうことができる。しかしながら、あまり高い又は低いpH条件下では、ケラチン物質の膨潤あるいは溶解が起り、該還元ケラチン物質はその原料の形態を保持し得なくなるので、通常pH1～8の範囲で還元を行うことが有利である。

還元の際の温度及び圧力には特に制約はなく、使用する還元剤の種類や原料の種類等に応じて広い範囲で変化させることができるが、還元温度としては室温で充分である。還元の際の圧力も又常圧で充分であるが、必要に応じて減圧下又は加圧下に反応を行なうこともできる。

また、還元は好ましくは不活性ガス雰囲気、例えば窒素中に行なうことができる。

上記の如き還元により、ケラチン物質中のジスルフィド結合は開裂するが、該還元ケラチン物質は還元媒体中で未処理時の原料の形態を保

持した状態で存在する。したがって、該還元ケラチン物質を尹通、遠心分離等の手段により容易に分離回収し、十分洗浄した後、下記の酵素処理工程に付することができる。該分離操作および洗浄操作は、ケラチン物質中の開裂により生じたチオール側鎖が分離操作中に酸化されることがないように注意することが必要であり、例えば不活性ガス雰囲気中で行うか、或いは、該還元媒体および洗浄液のpHを6以下に調整して該チオール側鎖の酸化に対して安定な状態で分離および洗浄操作を行なうことが好ましい。

pHの調整は、水溶性の酸性物質、例えば塩酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸；酢酸、プロピオン酸、 $\alpha$ -トルエンスルホン酸等の有機酸を添加することにより容易に行なうことができる。特に、生成するオリゴケラチンからの酸の分離の容易さ等の理由から、揮発性の酸、特に塩酸が好ましい。

上記の如くして得られる原料の形態を保持した還元ケラチン物質は、次いで酵素加水分解処

得られるオリゴケラチンの分子量の調整は、用いる酵素の種類、量、反応時間および温度等を適宜選ぶことにより行なうことができる。用いた酵素の失活を必要とする場合は、熱処理或いはpH調整など酵素化学の分野で公知の方法で行なうことができる。

上記の如くして得られるオリゴケラチン水溶液よりオリゴケラチンの分離回収は、ケラチンに付着せる不溶の異物質や不溶性固型分が存在する場合には、これらを尹通、遠心分離等の手段により除去した後、通常の方法例えば該オリゴケラチン水溶液を濃縮後、凍結乾燥することにより行なうことができる。

このようにして得られるオリゴケラチンは、白色乃至淡黄色の粉末であり、化粧品基材ととりわけ毛髪用の化粧品基材としての用途に用いることができる。

以上に述べた如く、オリゴケラチンを製造する際に従来或外尹通や透析等の精製工程が不可欠であり、かかる精製工程を必要とするために工

理に付する。本発明において、該酵素加水分解処理は、用いる加水分解酵素の活性が最適となるように調整された水溶液中で行なわれるが、該水溶液には水溶液のpHを調整するために加えられる少量の酸或いはアルカリと、用いる加水分解酵素のみしか含有されていないことが本発明の特徴の一つであり、利点でもある。上記加水分解酵素としては、ペプシンなどの酸性酵素およびパイン、プロナーゼ、トリプシンなどの中性酵素などが使用できる。しかしながら、還元ケラチンの有するチオール側鎖は水性媒体のpHが6以上では不安定で酸化され易く、容易にジスルフィド結合を形成する〔参考文献：大妻茂、「有機イオウ化合物の化学(上)」、化学同人、第2章、1968〕。従つて、好ましくはペプシンなどの酸性酵素を用いて加水分解処理を実施することが望ましい。また、酵素加水分解処理の温度は用いる酵素が最適活性を示すように制御する必要がある。例えば、ペプシンの場合で35～40℃の温度範囲が好ましい。

業規模でオリゴケラチンを製造するには多大なプラントを必要とし、多大な時間を要したのであるが、本発明はかかる精製工程を不要のものとし、多大なプラントを不要とし長時間を要せずきわめて簡単な工程でオリゴケラチンを製造することをはじめて可能にしたのである。

以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

羊毛繊維10gを1,000ccの2.0% (w/v) n-プロピルアルコール水溶液に浸漬し、溶液中に十分に酸素ガスを流す。そして、2.5mlのトリ-n-ブチルホスフィンを加え、室温で1日、置く振とうする。この時点で羊毛は、元のままの繊維状態を保っており、これを尹通し、エタノールにて洗浄した後、50℃にて減圧乾燥(約10mmHg)し、繊維状還元処理羊毛を得た。このようにして得られた繊維状還元処理羊毛10gを0.075Nの塩酸(pH1.5)1,000cc中に浸漬し、ペプシン200mgを加え、40℃に

て、1日、軽く振とうし、加水分解反応を行なう。加水分解反応が進むにつれ、羊毛繊維は塩酸中に溶解し、3～4時間後には、不溶部は殆んど無くなる。このようにして得られたオリゴケラチン塩酸溶液を濾過した後、エバポレーターで約300ccに濃縮し、そして凍結乾燥により淡黄色粉末オリゴケラチン9.8g(可溶化率98%)を得た。該オリゴケラチンをヨード酢酸にてカルボキシメチル化し、その分子量をゲル透過(セファデックスG-50使用)により求めた所1,100であつた。なお、以下の実施例に於ても、分子量は同様に求めた。

#### 参考例1

還元処理を施ささない未処理羊毛繊維10gを0.075Nの塩酸1,000ccに浸漬し、40℃にて、1日軽く振とうし、加水分解反応を行なつた。この時点で、繊維状羊毛は、大半残っており、これを濾過し、エタノールで洗浄、乾燥した所9.2gであつた。すなわち可溶化率は8%ということになる。

ブチルホスフィンの代りに亜硫酸水素ナトリウム20gを用い、還元反応分散媒として20% n-プロピルアルコール水溶液の代りに水1,000ccを用いる以外は、実施例-1と同様の操作を行なつた。その結果可溶化率92%で分子量1,100の淡黄色粉末オリゴケラチンを得た。

#### 実施例5

実施例-1に於て加水分解酵素としてペプシンの代りにパパイン200mgを用い加水分解反応溶媒のpHを6.8とする以外は実施例1と同じ操作を行なつた。その結果可溶化率50%で分子量1,500の淡黄色粉末オリゴケラチンを得た。

#### 実施例6

実施例-1に於て加水分解酵素としてペプシンの代りにプロナーゼP200mgを用い、加水分解反応溶媒のpHを7.2とする以外は実施例-1と同じ操作を行なつた。その結果、可溶化率85%で、分子量1,500の淡黄色粉末オリゴ

#### 実施例2

実施例-1に於て、還元剤としてトリ-n-ブチルホスフィンの代りにチオグリコール酸15mlを用い還元反応分散媒として20% n-プロピルアルコール水溶液の代りに水1,000ccを用いる以外は、実施例1と同じ操作を行なつた。その結果可溶化率93%で淡黄色粉末オリゴケラチンを得た。このものの分子量は1,000であつた。

#### 実施例3

実施例-1に於て、還元剤としてトリ-n-ブチルホスフィンの代りに2-メルカプトエタノール15mlを用い、還元反応分散媒として20% n-プロピルアルコール水溶液の代りに水1,000ccを用いる以外は、実施例1と同じ操作を行なつた。その結果可溶化率90%で、淡黄色粉末オリゴケラチンを得た。このものの分子量は1,000であつた。

#### 実施例4

実施例-1に於て、還元剤としてトリ-n-

ケラチンを得た。

出願人代理人 古 谷 馨